

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. Dezember 2003 (24.12.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 03/105883 A1

not Sk

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 38/17,
A61P 31/04, 31/10

MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/05694

(22) Internationales Anmeldedatum:
30. Mai 2003 (30.05.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 26 216.0 13. Juni 2002 (13.06.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): BAYER HEALTHCARE AG [DE/DE]; 51368 Lev-
erkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LADEL, Christoph
[DE/DE]; In den Birken 28, 42113 Wuppertal (DE).
NEWTON, Ben [GB/GB]; 15 Laurel Court, Long Park,
Chesham Bois, Amersham, Buckinghamshire HP6 5LP
(GB). LABISCHINSKI, Harald [DE/DE]; Katernberger
Schulweg 80, 42113 Wuppertal (DE). BRUNNER,
Nina [DE/DE]; Steinhausenstr. 19, 45147 Essen (DE).
GERDES, Christoph [DE/DE]; Christian-Hess-Str. 81,
51373 Leverkusen (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER HEALTHCARE AG;
Law and Patents, Patents and Licensing, 51368 Leverkusen
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die
folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG)

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TREATMENT OF SERIOUS INFECTIONS AND SEPTIC SHOCK

(54) Bezeichnung: BEHANDLUNG VON SCHWEREN INFEKTIONEN UND SEPTISCHEM SCHOCK

(57) Abstract: The invention relates to the use of rhesus theta defensin-1 (RTD-1) for the production of a medicament for the treat-
ment and/or prophylaxis of patients with serious infections (bacteraemia), including septic shock.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung von Rhesus-Theta-Defensin 1 (RTD-1) zur Herstellung eines
Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Patienten mit schweren Infektionen (Bakteriämien) inklusive septischem
Schock.

WO 03/105883 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Behandlung von schweren Infektionen und septischem Schock

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Rhesus-Theta-Defensin 1 (RTD-1) zur
5 Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Patienten
mit schweren Infektionen (Bakteriämien) inklusive septischem Schock.

Die Sepsis ist ein schweres, lebensbedrohendes Krankheitsbild resultierend aus einer
Infektion mit Bakterien auf systemischer Ebene (Bakteriämie) und weiteren
10 klinischen Befunden gemäß der international gültigen Definition (Madot, I. and
Sprung, C.L. (2001), Int. Care Med. 27, S.3-S.9), die unter anderem auch die
systemische Entzündungsreaktion des Körpers mit nachfolgendem Organversagen
umfasst. Durchbricht nach einer lokalen Infektion der Erreger die körpereigenen
Barrieren (z.B. Epithelien, Endothelien, Blut-Hirn-Schranke), so kann sich aus der
15 daraus resultierenden Bakteriämie eine Sepsis entwickeln. Die Keime gelangen fort-
laufend aus dem Sepsisherd (z.B. Abszess, Lunge, Magen-Darm-Trakt), der auch un-
erkannt bleiben kann, in die Blutbahn und damit in den gesamten Organismus. Die
ins Blut und andere immunologische Organe gelangten Keime werden durch Ab-
wehrfunktionen des Immunsystems zwar an ihrer Vermehrung gehindert, jedoch
20 meistens nicht vollständig zerstört. Außerdem kommt es durch den Angriff auf die
Keime durch das Immunsystem und auch durch Therapien mit bestimmten Anti-
biotika zur Freisetzung von bakteriellen Produkten wie Lipopolysaccharid (LPS),
Lipoteichonsäure (LTA) und ähnliche (Nau, R. und Eiffert, H. (2002), Clin.
Microbiol. Rev. 15, 95-110).

25

Eine Sepsis ist gekennzeichnet durch Fieber, Hypotonie und eine sogenannte Schock-
symptomatik (z.B. Schocklunge, Schockniere, gastrointestinale Blutungen; im Allge-
meinen als Multi-Organ-Versagen bezeichnet). Diese unterschiedlichen Symptome
sind die klinischen Zeichen pathophysiologischer Vorgänge, die durch die Keime
30 selbst oder ihre Produkte z.B. Endotoxine, Hämolysine oder Pyrogene bewirkt
werden. Als weitere Ursachen können auch pathologische Zustände wie starke Ver-

brennungen, Trauma oder akute Lungenveränderungen mit nachfolgender oder gleichzeitiger Besiedelung mit Bakterien, Pilzen oder Viren auftreten. Auch in diesen Fällen wird eine Schocksymptomatik festgestellt, wobei nur teilweise eine direkte Diagnose der Bakterien oder anderer Pathogene möglich ist.

5

Die Freisetzung von bakteriellen Produkten oder die Bakterien selbst führen zu einer Reaktion des Organismus durch das Immunsystem. Die patienteneigenen Faktoren des Immunsystems sind dabei sowohl protektiv als auch schädlich, abhängig von Konzentration, Wirkort und ähnlichem. Körpereigene Faktoren, die als Reaktion des Körpers auf externe Reize ausgeschüttet werden, interagieren in einer komplexen Art und Weise in den Geweben und führen dadurch unter Umständen zum Krankheitsbild der Sepsis. Der Auslöser dieser Ereignisse ist definitionsgemäß die Anwesenheit von Bakterien und/oder die Anwesenheit von bakteriellen Produkten wie LPS/LTA und andere. Dies führt zur Freisetzung von z.B. Tumor Nekrose Faktor- α , Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8), sowie Faktoren die die Gerinnung beeinflussen (z.B. Platelet Activating Factor, PAF) und Faktoren die regulatorisch auf das entstehende Entzündungsgeschehen eingreifen (wie z.B. Prostaglandine, Leukotriene, Interleukin-10). Durch eine Überreaktion des Körpers, und insbesondere des Immunsystems, entwickelt sich dabei aus der ursprünglich schützenden und infektabwehrenden Antwort das klinische Bild einer Bakteriämie und nachfolgend eine Sepsis (Cohen, J. (2002), Nature 420, 885-891). Zytokinanalysen in septischen Patienten zeigen dabei eine signifikante Korrelation mit Erhöhung von insbesondere IL-6, IL-8 sowie TNF- α und einer erhöhten Mortalität (Rodriguez-Gaspar, M. et al. (2001), Cytokine 15, 232-236).

25

Prinzipiell können zwar nahezu alle Mikroorganismen eine Bakteriämie und damit nachfolgend eine Sepsis auslösen, jedoch hängt die prozentuale Verteilung der Keime vom Alter des Patienten, der Grunderkrankung, dem primären Infektionsherd und ähnlichem ab (Knaus, W.A. et al. (1985), Crit. Care. Med. 13, 818-829). Leitkeime sind sowohl gram-positive wie auch gram-negative Bakterien, sowie Pilze bzw. Hefen (Llewelyn, M und Cohen, J. (2001), Int. Care Med. 27, S.10-S.32).

30

Therapieverfahren und Wirkstoffe, die die Freisetzung von derartigen Keimprodukten verhindern oder die derartige Produkte binden und neutralisieren oder die körpereigenen Funktionen und Faktoren beeinflussen oder zum Absterben der Keime führen, sind zur Behandlung von Symptomen der oben genannten Erkrankungen geeignet.

Substanzen und Verfahren, die zu einer Erniedrigung der Keimanzahl führen (z.B. Antibiotika) wie auch Substanzen mit kreislaufbeeinflussender Wirkung können therapeutisch genutzt werden (Forth, Henschler, Rummel; Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; Urban & Fischer Verlag (2001), München). Die Standardtherapie bei den oben beschriebenen Erkrankung sind Antibiotika zusammen mit kreislaufstabilisierenden und gerinnungsbeeinflussenden Substanzen oder Lösungen.

Ein weiterer Ansatz ist die Beeinflussung des Krankheitsbildes durch immunmodulatorische Behandlungen, um eine überschüssige Reaktion des Organismus auf Bakterien oder Bakterienprodukte zu verhindern oder zumindest abzumildern und damit ein Organversagen zu vermeiden (Zanotti, S. et al. (2002), Expert Opin. Investig. Drugs 11, 1061-1075).

Dabei sind auch lösliche Mediatoren des Immunsystems, die als Therapie zugeführt werden, von besonderem Interesse. Zu diesen Mediatoren gehören unter anderem auch die sogenannten Defensine, Moleküle mit anti-bakteriellen, anti-fungalen oder auch anti-viralen Eigenschaften (Kagan, B.L. et al. (1994), Toxicology 87, 131-149; Hancock R.E.W. und Scott M.G. (2000), PNAS 16, 8856-8861). Zusätzlich besitzen diese Moleküle, die kleine Peptide sind, modulatorische Eigenschaften auf das Immunsystem (Hancock R.E.W. und Scott M.G. (2000), PNAS 16, 8856-8861). Sie bewirken oder verhindern z.B. die Ausschüttung weiterer Mediatoren.

Selbst bei optimaler Behandlung nach dem derzeitigen Therapiestandard liegt die Mortalität bei Sepsis und Septischen Schock bei bis zu 50 % der Patienten (Cohen, J. (2002), Nature 420, 885-891). Daher sind zusätzliche therapeutische Behandlungen dringend erforderlich. In verschiedenen Ansätzen die verfolgt werden in der Behandlung von Patienten mit schweren Bakteriämien, Sepsis und/oder Septischem Schock zeigt sich jedoch auch bei neueren Therapien, dass eine Eingriff in das Krankheitsgeschehen an einem Punkt nicht, oder nur teilweise zum Erfolg führt. Eine Kombination von verschiedenen therapeutischen Ansätzen erweist sich als am erfolgversprechendsten in der Behandlung erkrankter Patienten (Anel, R.L. und Kumar, A. (2001) Expert. Opin. Investig. Drugs 10, 1471-1485).

Ein Defensin aus Immunzellen des Rhesusaffen (Rhesus-Theta-Defensin 1; RTD-1) wurde isoliert und seine Eigenschaften, seine breite antibakterielle Wirkung, auch gegen nicht wachsende Bakterien, sowie seine antifungische Wirkung im Detail beschrieben (Tang et al. (1999), Science 286, 498-502; Tran et al. (2002), J. Biol. Chem. 277, 3079-3084) und auch zum Patent angemeldet (WO-00/68265). RTD-1 zeichnet sich durch einige charakteristische und bestimmende Eigenschaften gegen andere Defensine oder kationische Peptide aus. Zum einen ist RTD-1 ein kleines zirkuläres Peptid, und dadurch im Gegensatz zu anderen Defensinen stabil gegen Abbau und Degradation. RTD-1 zeigt keine Abhängigkeit der Wirkung von Salzen im Medium, und dadurch keinen Wirkverlust bei Anwesenheit physiologischer Konzentrationen von verschiedenen Salzen wie z.B. NaCl, KCl etc. (Muhle et.al. (2001), Biochemistry 40, 5777-5785; Tang et al. (1999), Science 286, 498-502) und auch keinen Wirkverlust in Anwesenheit von humanem Serum (WO00/68265). Zusätzlich wurde kein hämolytische Wirkung festgestellt.

In der hier dargestellten Erfindung wird überraschend eine weitergehende Wirkung des RTD-1 in Zuständen der Bakteriämie mit nachfolgender Sepsis und septischem Schock, sowie derartige Krankheitszustände nach Exposition von bakteriellen Produkten wie zum Beispiel LPS gefunden. Dabei ist eine Wirkung auf 4 verschiedene pathologische Zustände, die relevant sind für das Krankheitsbild von schweren

Bakteriämien, Sepsis und septischem Schock, gefunden worden. RTD-1 greift in das Krankheitsgeschehen ein, indem es 1. anti-mikrobielle Wirkung gegen verschiedene Erreger zeigt, 2. eine neutralisierende Wirkung auf bakterielle Produkte wie LPS oder LTA (Wirkung auf Produkte von gram-positiven wie auch gram-negativen Bakterien) zeigt, was auch eine prophylaktische Therapie erlaubt, 3. immunmodulatorische Wirkung im Sinne einer Mediatorenmodulation bewirkt und 4. eine regulierte gerinnungshemmende Wirkung aufweist. Durch die kombinierte Wirkung auf verschiedene krankheitsrelevante Parameter wird ein eindeutig verbesserter Therapieerfolg bei vereinfachter Therapie erzielt. Außerdem schließt eine Therapie mit RTD-1 die derzeitigen Standardtherapien (z.B. Antibiotika, kreislaufstabilisierende Substanzen) nicht aus, und erlaubt eine Kombinationstherapie.

Die Therapie mit RTD-1 führt zu erhöhtem Überleben von Mäusen mit schwerer Bakteriämie nach Applikation lebender Bakterien, und zwar sowohl nach Infektion mit gram-positiven wie auch gram-negativen Bakterien. Dabei ist überraschenderweise keine Abhängigkeit mit der minimalen Hemmkonzentration von RTD-1 auf das verwendete Bakterium festzustellen.

Auch die Therapie von Mäusen mit Symptomen des septischen Schocks nach Gabe von LPS oder SEB zeigt ein deutlich gesteigertes Überleben unter Therapie mit RTD-1. Zytokinanalysen im Serum oder Plasma der Tiere zeigen eine Regulation der Freisetzung von löslichen Mediatoren. Dabei ist eine Erniedrigung von pro-inflammatorischen Zytokinen (wie z.B. TNF- α , IL-6, MIF) und eine Erhöhung regulatorischer Faktoren (wie z.B. IFN- γ , IL-10) darstellbar. Vergleichbare Ergebnisse werden in humanem Gesamtblut festgestellt, es kommt zu einer Erniedrigung der Werte für pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen.

Unter Einfluss von RTD-1 zeigt sich eine dosis-abhängige Zunahme der Gerinnungszeit von humanem Plasma und humanem Gesamtblut. RTD-1 zeigt also einen Einfluss auf die Gerinnungsparameter im humanen Blut ohne zusätzliche Beeinflussung der Gerinnung durch bakterielle Produkte wie z.B. LPS oder LTA.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher die Verwendung von Theta-Defensin aus dem Rhesusaffen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder der Prophylaxe von Bakteriämien und/oder Sepsis.

5

Dabei können die Krankheitsauslöser gram-positive Bakterien, gram-negative Bakterien, bakterielle Produkte, Viren oder Hefepilze sein.

10

Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung von RTD-1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Bindung bakterieller Produkte wie LPS und/oder LTA.

15

Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung von RTD-1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krankheitszuständen, die durch Veränderungen in der Blutgerinnung gekennzeichnet sind.

Des weiteren können die genannten Anwendungen in Kombination mit Standard-Antibiotika oder Standard-Antimykotika erfolgen.

BeispieleBeispiel 15 **Test auf anti-bakterielle Wirkung in-vitro**

10 Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration werden Bakterien verschiedener Stämme abgestuften Konzentrationen von RTD-1 ausgesetzt, wobei eine 1:2 Verdünnungsreihe verwendet wird. Die Bestimmung erfolgt nach den Grundsätzen der NCCLS (siehe Dokumentation: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria, NCCLS document M7-A5, Vol. 20 No. 2).

15 Tabelle 1: Minimale Hemmkonzentrationen von RTD-1, Vancomycin und Ampicillin auf verschiedene Bakterienspezies bestimmt nach NCCLS Methode. In der Tabelle sind die Konzentration der jeweiligen Verbindungen angegeben, die eine eindeutige Hemmung des Wachstums der Bakterien zeigten.

Bakterium	MHK [mg/L]		
	RTD-1	Vancomycin	Ampicillin
<i>S. aureus</i> MSSA	1	<0,125	0,5
<i>S. aureus</i> MRSA	8	1	>64
<i>E. faecalis</i>	2	2	2
<i>E. faecium</i>	1	0,5	4
<i>E. faecium</i> VRE	0,5	>64	64
<i>S. pneumoniae</i>	64	0,25	0,125
<i>E. coli</i>	16	>64	8
<i>P. aeruginosa</i>	32	>64	>64
<i>K. pneumoniae</i>	8	>64	2
<i>S. typhimurium</i>	8	>64	4

20 Tabelle 1: Minimale Hemmkonzentrationen von RTD-1, Vancomycin und Ampicillin auf verschiedene Bakterienspezies

Beispiel 2

In vivo Untersuchungen in krankheitsrelevanten Tiermodellen

5

Bakteriensuspensionen werden in CFW-1 Mäuse intraperitoneal (i.p.) appliziert. Die Mäuse werden von Harlan bezogen. Nach 30 min. werden die Tiere dann intravenös (i.v.) mit RTD-1 in verschiedenen Dosen therapiert. Das Überleben der Tiere mit und ohne Therapie ergibt den Therapieerfolg.

10

Tabelle 2: Überleben von Mäusen nach i.p. Infektion mit *S. aureus* im Bakteriämie-Modell und Therapie mit 0.1, 1 und 10 mg/kg RTD-1 i.v.. Die Mäuse werden mit 1.68×10^7 Kolonien *S. aureus* ATCC Smith i.p. infiziert und nach 30 min mit den angegebenen Dosen i.v. therapiert. In der Tabelle sind die % Überlebenden aus n= 6 Mäusen an Tag 5 nach Infektion angegeben.

15

Dosis	% Überleben
kein RTD-1 (Kontrolle)	17
0.1 mg/kg	67
1 mg/kg	83
10 mg/kg	83

Tabelle 2: Überleben von *S. aureus* infizierten Mäusen mit und ohne RTD-1 Therapie

20

Tabelle 3: Überleben von Mäusen nach i.p. Infektion mit *S. pneumoniae* im Bakteriämie-Modell und Therapie mit 0.1, 1 und 10 mg/kg RTD-1 i.v.. Die Mäuse werden mit 3×10^3 Kolonien *S. pneumoniae* L3TV i.p. infiziert und nach 30 min mit den angegebenen Dosen i.v. therapiert. In der Tabelle sind die % Überlebenden aus n= 6 Mäusen an Tag 5 nach Infektion angegeben.

25

Dosis	% Überleben
kein RTD-1 (Kontrolle)	17
0.1 mg/kg	50
1 mg/kg	67
10 mg/kg	33

Tabelle 3: Überleben von *S. pneumoniae* infizierten Mäusen mit und ohne RTD-1 Therapie

5

Tabelle 4: Überleben von Mäusen nach i.p. Infektion mit *E.coli* im Bakteriämie-Modell und Therapie mit 0.1, 1 und 10 mg/kg RTD-1 i.v.. Die Mäuse werden mit 1.68×10^7 Kolonien *E.coli* Neumann i.p. infiziert und nach 30 min mit den angegebenen Dosen i.v. therapiert. In der Tabelle sind die % Überlebenden aus n= 6 Mäusen an Tag 5 nach Infektion angegeben.

10

Dosis	% Überleben
kein RTD-1 (Kontrolle)	33
0.1 mg/kg	50
1 mg/kg	83
10 mg/kg	83

Tabelle 4: Überleben von *E.coli* infizierten Mäusen mit und ohne RTD-1 Therapie

15

Beispiel 3

Außerdem wird LPS in Mäuse i.p. injiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der LPS-Gabe wird RTD-1 in verschiedener Dosierung i.v. appliziert, um einen septischen Schock zu simulieren. Das Überleben der Tiere ist das Maß für den Therapieerfolg im Modell für den septischen Schock.

20

- 10 -

5 Tabelle 5: Überleben von Mäusen nach i.p. Applikation von 20 mg/kg LPS von *S.typhimurium* (Sigma) und Therapie mit 0.1, 1 und 10 mg/kg RTD-1 i.v. zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach LPS-Gabe. In der Tabelle sind die % Überlebenden aus n= 5 Mäusen an Tag 5 nach LPS-Gabe angegeben.

Dosis	% Überleben				
	-2h	-1h	+0.1h	+1h	+2h
kein RTD-1 (Kontrolle)			0		
0.1 mg/kg	100	100	100	100	80
1 mg/kg	100	100	100	100	100
10 mg/kg	80	80	100	80	80

Tabelle 5: Überleben von LPS-behandelten Mäusen mit und ohne RTD-1 Therapie

10 Beispiel 4

Untersuchungen zur Bindung bakterieller Produkte

Die Bindung von RTD-1 an Lipopolysaccharid (LPS) und Lipoteichonsäure (LTA) wird in einem Bindungsansatz in-vitro untersucht. Dabei wird Dansyl-Polymyxin B verwendet (Moore et al. (1986), Antimicrob. Agents Chemotherap. 29, 496-500), das 15 nach Bindung an LPS oder LTA fluoresziert. In Kommpetition mit RTD-1 ergibt sich eine Abnahme der Fluoreszenz und daraus resultierend eine Bestimmung der relativen Inhibition der Bindung von Dansyl-Polymyxin B.

20 Aus der Inhibition lässt sich wiederum eine relevante Affinität des RTD-1 bezüglich einer Bindung bakterieller Produkte berechnen.

25 Tabelle 6: LPS und LTA Bindung durch RTD-1 und Polymyxin B nach 4 Stunden Inkubation. Angegeben ist die Konzentration, bei der die Fluoreszenz von Dansyl-Polymyxin um 50 % verringert wird.

Testsubstanz	50 % LPS Bindung bei μM	50 % LTA Bindung bei μM
RTD1	0,001	0,1
Polymyxin B	4,9	0,01

Tabelle 6: LPS und LTA Bindung durch RTD-1 und Polymyxin B.

5 Beispiel 5

Die Membranpermeabilität von Bakterien unter Einfluss von RTD-1 wird untersucht indem eine Fluoreszenzmethode angewandt wird (Silvestro et al. (2000), Antimicrob. Agents Chemotherap. 44, 602-607). Dies erlaubt eine Bewertung des Potentials des
 10 RTD-1 bezüglich Schädigungen der Zellmembran von Bakterien und damit auf die Freisetzung von bakteriellen Produkten.

Tabelle 7: Membranpotentialänderung unter Einfluss von RTD-1 und Polymyxin B nach 10 Minuten Einwirkung auf *S. aureus* Bakterien. Dargestellt ist Konzentration,
 15 die zu einer 50 %igen Änderung des Fluoreszenzsignals führt.

Testsubstanz	50 % Fluoreszenzänderung bei μM
RTD1	3,9
Polymyxin B	>75

Tabelle 7: Membranpotentialänderung unter Einfluss von RTD-1 und Polymyxin B.

20 Beispiel 6

Des weiteren wird der Einfluss von RTD-1 auf die Zellwandsynthese von Bakterien untersucht. Dabei wird RTD-1 zu einer Membranfraktion aus *E. coli* (als Beispiel

für gram-negative Bakterien) oder aus *Bacillus megaterium* (als Beispiel für gram-positive Bakterien) und den notwendigen Substraten gegeben und die hemmende Aktivität bestimmt (Chandrakala, B. *et al.* (2001) Antimicrob. Agents Chemother. 45, 768-775). Dieser Ansatz bestimmt den Einbau radioaktiver Vorstufen in hochmolekulares Peptidoglykan über Bindung an Weizenkeimagglutinin. Ein Einfluss von RTD-1 auf die Zellwandsynthese in Bakterien gibt wesentliche Aufschlüsse auf eine Wirkung auf das Bakterium (z.B. Lyse) und insbesondere im Zusammenhang mit der Freisetzung bakterieller Produkte, was eine wesentliche Voraussetzung für die Beurteilung des therapeutischen Potentials von RTD-1 in schweren Infektionen inklusive septischem Schock ist.

Tabelle 8: Inhibition der Zellwandsynthese durch RTD-1, Ampicillin (Sigma), ein Lactam Antibiotikum, Chloramphenicol (Sigma), ein Proteinbiosynthesehemmer und Vancomycin (Sigma), ein Glycopeptid Antibiotikum. Dargestellt ist die Inhibition der Bindung an Weizenkeimagglutinin von radioaktiven Vorstufen in hochmolekulares Peptidoglykan. Nur Substanzen mit Einfluss auf die Zellwandbiosynthese, aber nicht Proteinbiosynthesehemmer zeigen eine Inhibition in diesem Ansatz.

Testsubstanz	Gram-negativ 50 % Inhibition bei μM	Gram-positiv 50 % Inhibition bei μM
Ampicillin	8,8	5,0
Chloramphenicol	>100	>100
Vancomycin	4,4	0,85
RTD1	7,2	5,7

Tabelle 8: Inhibition der Zellwandsynthese bei gram-negativen und gram-positiven Bakterien bzw. Bakterienlysaten durch RTD-1, Ampicillin, Vancomycin und Chloramphenicol.

Beispiel 7**Untersuchungen zum Einfluss auf Thromboplastinzeit (PT)**

5 Dieser Parameter wird zur Bestimmung von Störungen im exogenen System der Blutgerinnung eingesetzt. Die Bestimmung der Thromboplastinzeit erfolgt im Zitrat-Plasma nach Zugabe von Calcium und Gewebefaktor. Dafür wird Blut von gesunden Menschen beiderlei Geschlechts in Sammelgefäßen mit Zitrat (Monovetten, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) abgenommen und das Plasma nach Zentrifugation ge-
10 wonnen. Proben dieses Plasmas werden mit verschiedenen Konzentrationen der Testverbindungen für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wird Thromplastin (Recombiplastin, OrthoDiagnostic Systems, Neckargemünd, Deutschland) zugegeben um die den exogenen Weg der Blutgerinnung zu starten. In einem Gerät zur Gerinnungsbestimmung (Coagulometer, Amelung, KC 4A micro) wird dieser Ansatz
15 gemixt und Gerinnungszeit bestimmt.

Untersuchungen zum Einfluss auf die partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

20 Dieser Parameter wird zur Bestimmung von Störungen im endogenen System der Blutgerinnung eingesetzt. Die Bestimmung der Thromboplastinzeit erfolgt im Zitrat-Plasma nach Zugabe eines Aktivators und Phospholipid. Dafür wird Blut von gesunden Menschen beiderlei Geschlechts in Sammelgefäßen mit Zitrat (Monovetten, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) abgenommen und das Plasma nach Zentrifugation gewonnen. Proben dieses Plasmas werden mit verschiedenen Konzentrationen
25 der Testverbindungen für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wird der Aktivator Kaolin und Phospholipid (aPTT Reagenz, Diagnostica Stago, Asnieres, Frankreich) zugegeben. Die Gerinnung wird gestartet durch Zugabe von 0,025 M Calciumchlorid zu diesem Gemisch. In einem Gerät zur Gerinnungsbestimmung (Coagulometer, Amelung, KC 4A micro) wird dieser Ansatz gemixt und Gerinnungszeit bestimmt.

Tabelle 10: Beeinflussung der Gerinnungsparameter aPTT, PT, sowie die Gerinnungszeit von humanem Gesamtblut unter Einfluss von RTD-1. Dargestellt ist gemessene Gerinnungszeit in Sekunden nach Zugabe von RTD-1.

RTD-1 Konzentration in µg/ml	Gerinnungszeit [Sek.] aPTT	PT	Gesamt Blut
0 (Kontrolle)	33,9	14,55	351,94
5	35,4	15,7	368,2
10	36,6	21,2	375,2
30	43,4	51,3	475,4
50	112,7	67,0	598,3
100	297 (gestoppt)	102,8	1000 (gestoppt)

5

Tabelle 10: Beeinflussung der Gerinnungsparameter aPTT, PT, sowie die Gerinnungszeit von humanem Gesamtblut unter Einfluss von RTD-1.

Beispiel 8

10

***In vivo* Zytokin Untersuchungen in krankheitsrelevanten Tiermodellen**

15 Zu verschiedenen Zeitpunkten nach LPS oder SEB Gabe in Mäusen werden Blutproben durch Entbluten der Tiere gewonnen. Aus diesen Blutproben werden Plasma-
proben gezogen und einer Zytokinanalyse unterworfen. Die Zytokinmenge im
Plasma wird quantitativ mittels der CBA Methoden bestimmt (CBA system,
BectonDickinson, Heidelberg, Deutschland).

20 Tabelle 11: Zytokinmodulation nach Therapie mit RTD-1 im Mausmodell des
septischen Schocks nach Verabreichung von LPS. Angegeben ist die maximale
prozentuale Änderung im Vergleich zur unbehandelten LPS-Kontrolle. Negative

Werte geben ein Verringerung, positive Werte ein Steigerung der Zytokinmenge im Plasma an.

Zytokin	Änderung in % der unbehandelten LPS Kontrolle bei intravenöser Therapie mit		
	RTD-1 0,1 mg/kg	RTD-1 1 mg/kg	RTD-1 10 mg/kg
TNF- α	-47,5	-41,1	-12,4
IL-6	-41,6	-5,8	
IL-10	+157	+159	+241
IFN- γ	+53	+138	+69

- 5 Tabelle 11: Zytokinmodulation nach Therapie mit RTD-1 im Mausmodell des septischen Schocks nach Verabreichung von LPS.

- 10 Tabelle 12: Zytokinmodulation nach Therapie mit RTD-1 im Mausmodell des septischen Schocks nach Verabreichung von SEB. Angegeben ist die maximale prozentuale Änderung im Vergleich zur unbehandelten SEB-Kontrolle. Negative Werte geben ein Verringerung, positive Werte ein Steigerung der Zytokinmenge im Plasma an.

Zytokin	Änderung in % der unbehandelten SEB Kontrolle bei intravenöser Therapie mit		
	RTD-1 0,1 mg/kg	RTD-1 1 mg/kg	RTD-1 10 mg/kg
TNF- α	-32,3	-29,7	-39,3
IFN- γ	+8,2	+4,6	+28,6

- 15 Tabelle 12: Zytokinmodulation nach Therapie mit RTD-1 im Mausmodell des septischen Schocks nach Verabreichung von SEB.

Beispiel 9***Ex vivo* Zytokin Untersuchungen im infizierten Humanblut**

5 Von gesunden Spendern wird Blut abgenommen und in vitro mit Bakterien infiziert. Dabei werden sowohl gram-positive Erreger (*S. aureus*), wie auch gram-negative Erreger (*E. coli*) verwendet. Nach Zugabe der Erreger werden zu definierten Zeitpunkten Proben des infizierten und des infizierten und behandelten Blutes genommen und durch Zentrifugation das Plasma gewonnen. Die Zytokinmenge im Plasma wird
 10 quantitativ mittels der CBA Methoden bestimmt (CBA system, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Zusätzlich erfolgt die Analyse auf MIF durch ELISA Technik (human MIF ELISA System, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA).

15 Tabelle 13: Zytokinmodulation nach Therapie mit RTD-1 im Infektionsmodell mit humanem Gesamtblut nach Verabreichung von *S. aureus*. Angegeben ist die maximale prozentuale Änderung von pro-inflammatorischen Mediatoren im Vergleich zur unbehandelten Infektionskontrolle. Negative Werte geben ein Verringerung, positive Werte ein Steigerung der Zytokinmenge in der Blutkultur an.

Zytokin	Änderung in % der unbehandelten Infektionskontrolle bei Therapie mit		
	RTD-1 0,1 µg/ml	RTD-1 1 µg/ml	RTD-1 10 µg/ml
TNF-α	-79	-85	-43
IL-1β	-71	-73	-10
IL-6	-58	-73	-3
IL-8	-17	-25	-3
MIF	-48	-44	-4

20

Tabelle 13: Zytokinmodulation nach Therapie mit RTD-1 im Infektionsmodell mit humanem Gesamtblut nach Verabreichung von *S. aureus*.

Tabelle 14: Zytokinmodulation nach Therapie mit RTD-1 im Infektionsmodell mit humanem Gesamtblut nach Verabreichung von *E. coli*. Angegeben ist die maximale prozentuale Änderung im Vergleich zur unbehandelten Infektionskontrolle. Negative Werte geben eine Verringerung, positive Werte eine Steigerung der Zytokinmenge in der Blutkultur an.

Zytokin	Änderung in % der unbehandelten Infektionskontrolle bei Therapie mit	
	RTD-1 10µg/ml	RTD-1 100µg/ml
TNF-α	-8	-4
IL-6	-43	-20
MIF	-77	-41

Tabelle 14: Zytokinmodulation nach Therapie mit RTD-1 im Infektionsmodell mit humanem Gesamtblut nach Verabreichung von *E. coli*

Formulierungen

RTD-1 kann in bekannter Weise in die üblichen Formulierungen überführt werden, wie Tabletten, Dragees, Pillen, Granulate, Aerosole, Sirupe, Emulsionen, Suspensionen und Lösungen, unter Verwendung inerter, nicht toxischer, pharmazeutisch geeigneter Trägerstoffe oder Lösungsmittel. Hierbei soll die therapeutisch wirksame Verbindung jeweils in einer Konzentration von 0,5 bis 90 Gew.-% der Gesamtmischung vorhanden sein, d.h. in Mengen, die ausreichend sind, um den angegebenen Dosierungsspielraum zu erreichen.

Die Formulierungen werden beispielsweise hergestellt durch Strecken der Wirkstoffe mit Lösungsmitteln und/oder Trägerstoffen, gegebenenfalls unter Verwendung von Emulgiermitteln und/oder Dispergiermitteln, wobei z.B. im Fall der Benutzung von Wasser als Verdünnungsmittel gegebenenfalls organische Lösungsmittel als Hilfslösungsmittel verwendet werden können.

Die Applikation erfolgt in üblicher Weise, vorzugsweise intravenös, transdermal, oral oder parenteral, insbesondere oral oder intravenös. Sie kann aber auch durch Inhalation über Mund oder Nase, beispielsweise mit Hilfe eines Sprays erfolgen, oder
5 topisch über die Haut.

Im Allgemeinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, Mengen von etwa 0,001 bis 10 mg/kg, bei oraler Anwendung vorzugsweise etwa 0,005 bis 3 mg/kg Körpergewicht zum Erzielen wirksamer Ergebnisse zu verabreichen.

10 Trotzdem kann es gegebenenfalls erforderlich sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit vom Körpergewicht bzw. der Art des Applikationsweges, vom individuellen Verhalten gegenüber dem Medikament, der Art von dessen Formulierung und dem Zeitpunkt bzw. Intervall, zu welchen die Verabreichung erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend sein, mit weniger als der vor-
15 genannten Mindestmenge auszukommen, während in anderen Fällen die genannte obere Grenze überschritten werden muss. Im Falle der Applikation größerer Mengen kann es empfehlenswert sein, diese in mehreren Einzelgaben über den Tag zu verteilen.

20

Literaturliste:

- Chandrakala, B. *et al.* (2001) *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 768-775
- Forth, Henschel, Rummel (2001), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und*
5 *Toxikologie*; Urban&Fischer Verlag, München
- Moore *et al.* (1986), *Antimicrob. Agents Chemotherap.* 29, 496-500
- Muhle *et al.* (2001), *Biochemistry* 40, 5777-5785
- Silvestro *et al.* (2000), *Antimicrob. Agents Chemotherap.* 44, 602-607
- Tang *et al.* (1999), *Science* 286, 498-502
- 10 Tran *et al.* (2002), *J. Biol. Chem.* 277, 3079-3084

Abkürzungsliste:

ATCC	American Type Culture Collection
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
MHK	Minimale Hemmkonzentration
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
RTD	Rhesus Theta Defensin

Patentansprüche

1. Verwendung von RTD-1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Bakteriämien.
- 5 2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die Krankheitsauslöser gram-positive Bakterien, gram-negative Bakterien, bakterielle Produkte oder Hefepilze sind.
- 10 3. Verwendung von RTD-1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Bindung bakterieller Produkte wie LPS und/oder LTA.
4. Verwendung von RTD-1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder der Prophylaxe des septischen Schocks.
- 15 5. Verwendung gemäß Anspruch 4, wobei die Krankheitsauslöser gram-positive Bakterien, gram-negative Bakterien, bakterielle Produkte oder Hefepilze sind.
6. Verwendung gemäß Anspruch 1 in Kombination mit Standard-Antibiotika.
- 20 7. Verwendung gemäß Anspruch 1 in Kombination mit Standard-Antimykotika.
8. Verwendung gemäß Anspruch 4 in Kombination mit Standard-Antibiotika.
9. Verwendung gemäß Anspruch 4 in Kombination mit Standard-Antimykotika.
- 25 10. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels enthaltend RTD-1 sowie pharmazeutische Hilfsmittel.

- 1 -

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer AG

<120> Behandlung von schweren Infektionen und septischem Schock

<130> Le A 36 086

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Rhesusaffe

<400> 1

Gly Phe Cys Arg Cys Leu Cys Arg Arg Gly Val Cys Arg Cys Ile Cys

1

5

10

15

Thr Arg

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT 03/05694

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/17 A61P31/04 A61P31/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 68265 A (OUELLETTE ANDRE J ;SELSTED MICHAEL E (US); TANG YI QUAN (US); UNIV) 16 November 2000 (2000-11-16) cited in the application page 35, line 18 -page 37, line 21; claims 1-4,26-33; example III	10
A	S.A. MUHLE ET AL.: "Design of gram-negative selective antimicrobial peptides." BIOCHEMISTRY., vol. 40, no. 19, 2001, pages 5777-5785, XP002256643 EASTON, PA, US cited in the application page 5778, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 1	1-10
	--- -/-	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 October 2003

Date of mailing of the international search report

17/10/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No.

PCT/EP 03/05694

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Y.-Q. TANG ET AL.: "A CYCLIC ANTIMICROBIAL PEPTIDE PRODUCED IN PRIMATE LEUKOCYTES BY THE LIGATION OF TWO TRUNCATED ALPHA-DEFENSINS" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 286, no. 5439, 1999, pages 498-502, XP000919300 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document</p>	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT 03/05694

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0068265	A	16-11-2000	US 6335318 B1	01-01-2002
			AU 4837300 A	21-11-2000
			CA 2372821 A1	16-11-2000
			EP 1187850 A1	20-03-2002
			WO 0068265 A1	16-11-2000
			US 2003162718 A1	28-08-2003
			US 6514727 B1	04-02-2003

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Ir. onales Aktenzeichen

P P 03/05694

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K38/17 A61P31/04 A61P31/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00 68265 A (OUELLETTE ANDRE J ;SELSTED MICHAEL E (US); TANG YI QUAN (US); UNIV) 16. November 2000 (2000-11-16) in der Anmeldung erwähnt Seite 35, Zeile 18 -Seite 37, Zeile 21; Ansprüche 1-4,26-33; Beispiel III	10
A	S.A. MUHLE ET AL.: "Design of gram-negative selective antimicrobial peptides." BIOCHEMISTRY., Bd. 40, Nr. 19, 2001, Seiten 5777-5785, XP002256643 EASTON, PA, US in der Anmeldung erwähnt Seite 5778, linke Spalte, Absatz 2 -rechte Spalte, Absatz 1	1-10



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Oktober 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17/10/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ryckebosch, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In onales Aktenzeichen

PCT/EP 03/05694

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>Y.-Q. TANG ET AL.: "A CYCLIC ANTIMICROBIAL PEPTIDE PRODUCED IN PRIMATE LEUKOCYTES BY THE LIGATION OF TWO TRUNCATED ALPHA-DEFENSINS" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, Bd. 286, Nr. 5439, 1999, Seiten 498-502, XP000919300 ISSN: 0036-8075 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/JP 03/05694

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0068265 A	16-11-2000	US 6335318 B1	01-01-2002
		AU 4837300 A	21-11-2000
		CA 2372821 A1	16-11-2000
		EP 1187850 A1	20-03-2002
		WO 0068265 A1	16-11-2000
		US 2003162718 A1	28-08-2003
		US 6514727 B1	04-02-2003

THIS PAGE BLANK (USPTO)